

ホルムアルデヒド投与によるマウス肝への該物質の蓄積 ならびにグルコース・システイン投与 による該物質の蓄積防止効果

藤井 実・松崎 司郎*

(生物化学教室)

昭和48年3月26日 受理

Preventive Effect of Glucose-Cysteine on Accumulation of Formaldehyde in Mouse Liver

Minoru FUJII and Shiro MATSUZAKI

(Laboratory of Biological Chemistry)

Received March 26, 1973

Summary

The preventive effect of glucose-cysteine on accumulation of formaldehyde in liver was examined using mice which were hypodermically injected with formaldehyde. Glucose-cysteine was injected hypodermically to one group of mice immediately after formaldehyde was administered, and no glucose-cysteine was injected to the other group. These mice were sacrificed at two days and six days after injection of glucose-cysteine. The amounts of formaldehyde in the liver were determined by iodine titration method.

Remarkable accumulation of formaldehyde was observed in the liver of mice to which no glucose-cysteine was injected. Injection of glucose-cysteine, however, resulted in little accumulation of formaldehyde.

ホルムアルデヒド (HCHO) は昔から動物組織の固定ならびに防腐剤として使用されてきたが、最近では接着剤としての用途が広まり、工業的にその大量生産が行なわれるようになった。その反面 HCHO のもつ毒性についても強い関心が払われるようになった。HCHO の中毒例としては、例えば標本動物組織固定用に使用されたホルマリン溶液から、その蒸気を吸収し、そのため視覚の錯乱を来した研究者がいる。また大量の HCHO を使用する合板製造工場や HCHO の生産工場等においては、その製造過程において就業労働者が大挙中毒に落ちいる危険性が常に存在する。

さて HCHO の $>CO$ に L-システイン (L-CySH) が付加していわゆるチアゾリン¹⁾ が生成されることは1954年に報告されている。そこで HCHO と L-CySH の反応について詳細な反応条件を求め、つぎに生体に HCHO および L-CySH を投与して、その肝における HCHO 蓄積量を測定し、L-CySH による HCHO の除去について、ある程度の好成績を収めたのでその結果について報告する。

本論文の概要は、昭和46年10月17日に開催された日本栄養食糧学会西日本支部大会において発表した。

* 現勤務先：九州三共株式会社

1 試 薬

1) 1g/dl HCHO 溶液

37%の HCHO 溶液 (S.G. 1.083) 2.5 ml を水で 100 ml に希釈した. これを必要に応じて 0.1 g/dl 溶液とした.

2) 100 mg/dl CySH 溶液

3) 0.01 N NaHSO₃ 溶液

NaHSO₃ 0.52 g を水に溶解して 100 ml とする. これをさらに 10 倍に希釈して 0.01 N I₂ 溶液で滴定してそのファクターを求める.

4) 0.01N 沃素溶液

約 1.27 g の I₂ を秤量し, これをあらかじめ純 KI の結晶 20~25 g を少量の水 (5 ml) に溶解しておいた溶液中に水で洗い込み, I₂ が全く溶解したのち水で 1 l とする. ファクターは 0.01 N Na₂S₂O₃ を使用して求める.

5) 0.01N Na₂S₂O₃ 溶液

純結晶の Na₂S₂O₃·5H₂O 約 2.5 g を水でとくして 1 l とする. この溶液で, 0.01 N KIO₃ 溶液一定量に過剰の KI および酸を添加して遊離する I₂ を滴定してファクターを求める.

6) 1g/dl 澱粉溶液

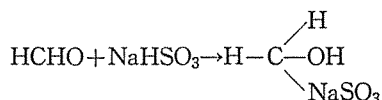
可溶性澱粉 1 g を冷水 100 ml 中に投じ, たえず攪拌しつつ徐々に温め, 完全に溶解させてから水を加えて 100 ml とし, 濾過して使用する.

7) D-glucose L-cysteine 日本理化学薬品 (株) 製

2 実験方法および結果

1) HCHO の沃素滴定法

HCHO は微酸性において NaHSO₃ と反応して, 下記のような生成物を作ることは周知の事実である.



そこで 0.1 g/dl HCHO 溶液に過剰の 0.01 N NaHSO₃ 15 ml, pH 5.5 McILVAINE 緩衝液の 20 ml

Table 1. Reaction between Formaldehyde and Sodium bisulfite.

HCHO (0.1g/dl) (ml)	NaHSO ₃ (N/100: ml)	I ₂ Soln. (N/100) Titration Value (ml)	I ₂ Soln. Corrospounding to HCHO	HCHO (mg) (Calculated)
0	15.0	14.325	0	0
0.2	15.0	13.080	1.322	0.198
0.4	15.0	11.587	2.907	0.436
0.6	15.0	10.220	4.358	0.654
0.8	15.0	9.060	5.590	0.839
1.0	15.0	7.975	6.742	1.011
1.2	15.0	6.975	7.229	1.174
1.4	15.0	5.850	8.955	1.343
1.6	15.0	4.490	10.123	1.519

を添加した後、残存する未反応の NaHSO_3 を 0.01 N 沃素溶液で滴定した。対照は NaHSO_3 溶液のみの滴定に要した沃素溶液の滴定値である。なお NaHSO_3 を I_2 で滴定する場合、 NaHSO_3

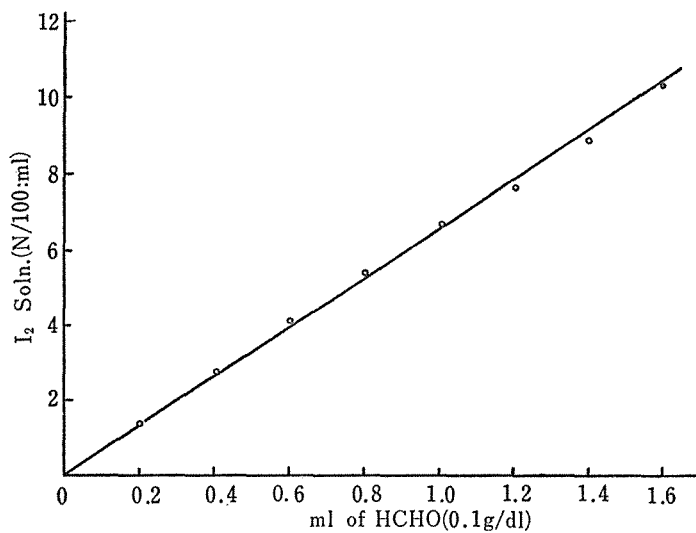


Fig. 1. Titration of formaldehyde with iodine.

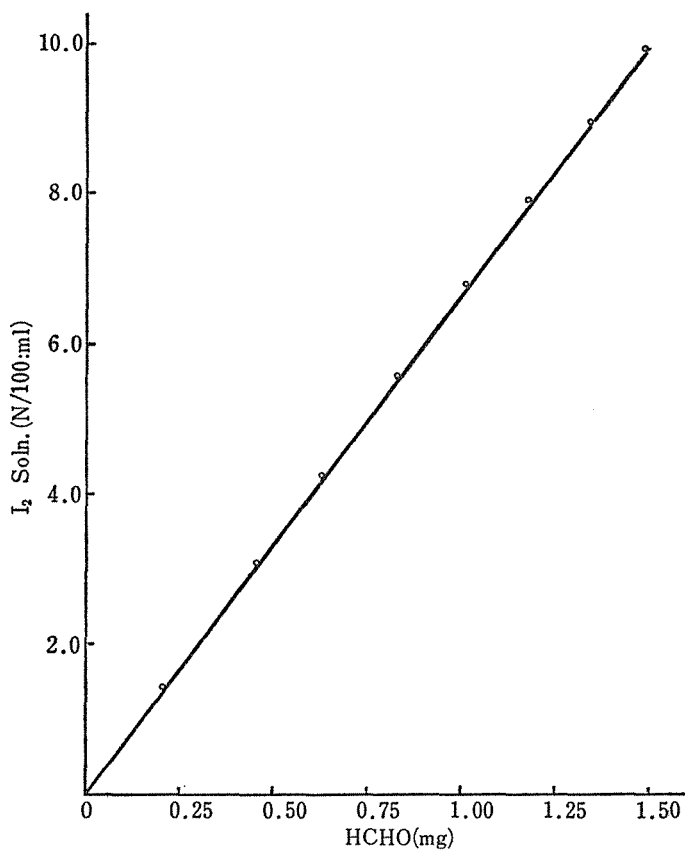


Fig. 2. Standard curve of formaldehyde.

の濃度が 0.01 N であるから酸化反応²⁾ は正確に進行する。

実験結果は HCHO と NaHSO_3 が比例的に反応していることを示している。したがって I_2 溶液 (対照値と滴定値の差 ml) がわかれば Fig. 2 で示される検量線から HCHO の mg 数がわかる。

2) HCHO と L-CySH の反応

L-CySH は HCHO と反応してチアゾリンを生じる。そこで 0.1 g/dl HCHO 溶液一定量にそれと反応するには不十分な量の L-CySH を添加し、 $\text{pH } 7$ の緩衝溶液 20 ml を添加し 40°C , $5\sim 10$ 分間反応させた。そして過剰の HCHO に 0.01 N NaHSO_3 溶液 15 ml を添加して反応させ、 0.5 M クエン酸溶液ならびに NaHCO_3 粉末を使用して pH を 5.5 に調整した後、 0.01 N 沃素溶液で滴定を行なった。

Table 2. Reaction between formaldehyde and L-cysteine.

HCHO (0.1 g/dl ; ml)	0	1.0	1.0	1.0	1.0
L-CySH (100 mg/dl ; ml)	0	0	1.0	2.0	3.0
NaHSO_3 ($\text{N}/100$; ml)	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Titration value of I_2 ($\text{N}/100$)	15.362	6.810	8.640	10.346	11.801
NaHSO_3 (ml) corresponding to HCHO	0	8.552	6.722	5.016	3.561
NaHSO_3 (ml) corresponding to L-CySH	0	0	1.830	3.536	4.991
HCHO (ml) corresponding to L-CySH	0	0	0.275	0.530	0.749

以上の結果により L-CySH 溶液の ml に相当する HCHO の量は Fig. 3 から明らかのように、比例的関係を示した。すなわち L-CySH は HCHO と定量的に反応することが示された。

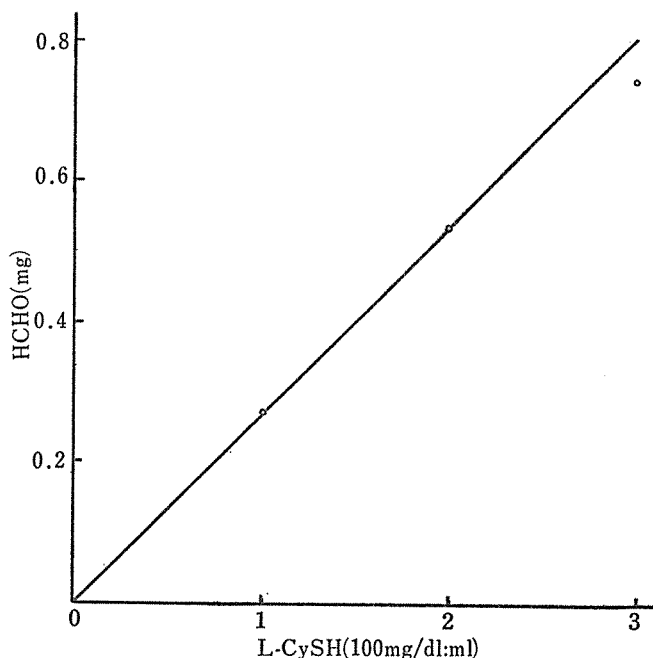


Fig. 3. Reaction between L-cystelne and formaldehyde.

3) HCHO の投与による HCHO の蓄積とグルコースシスチン投与による HCHO 除去効果

HCHO の皮下注射による生体肝への HCHO の蓄積量と HCHO と同時に L-CySH を投与した場合における HCHO の蓄積量の差異を比較検討した。マウスを 5 匹あて試験区、対照区および無処理区の 3 群に分け、試験区および対照区には HCHO 液 (1 g/dl) 0.1 ml を皮下注射し、試験区にはさらにグルコース・シスチン (G-CySH, L-CySH として 11 mg/dl) を 0.1 ml 宛注射した。そして注射を行なった日から数日後に肝を取り出し、これに 0.01 N NaHSO₃ 20 ml および pH 5.5 の緩衝溶液 10 ml を添加し磨砕した。これに 0.1M CH₃ICOOH 5 ml を添加し、さらに粉末 NaHCO₃ を加えて溶液の pH を 7 とし、40°C, 10 分間放置した後、2% メタリン酸 10 ml および HCl (1: 1) を加えて pH を 2 とした後遠心分離をした。その上澄液に粉末 NaHCO₃ を加えて pH を 5.5 に上げ 0.01 N I₂ 溶液で滴定した。この値から無処理区の肝より得られる I₂ 滴定値を差引いたものを HCHO に相当する滴定値とした。

そして生肝 100 g 中の HCHO を計算してつぎの結果を得た。すなわち実験の 2 日後には対照区では 3.9 mg の HCHO の蓄積がみられたのに対し、試験区のそれは 0.6 mg、6 日後には対照区では 29.6 mg の HCHO の蓄積となったが試験区のそれはわずかに 4.5 mg であった。

これを示すと Fig. 4 のようになる。

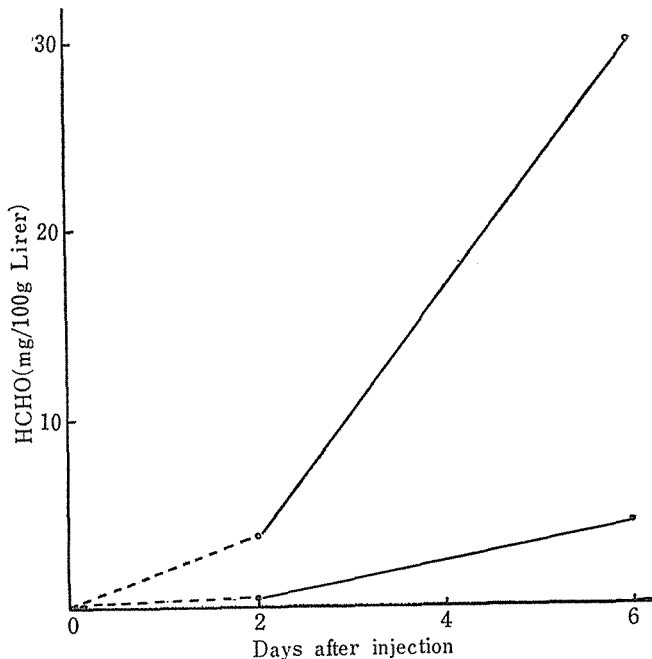


Fig. 4. Detoxification of formaldehyde with glucose-cysteine.

○: accumulation of HCHO injected.

●: accumulation of HCHO when glucose-cysteine was injected after HCHO was given.

肝成分中には I₂ と反応する物質として SH 化合物やアスコルビン酸 (AsA) 等が考えられる。SH 化合物についてはあらかじめ CH₃ICOOH を添加することによって I₂ に対する SH 化合物の反応を防除することができた。また上述の試料処理におけるメタリン酸は除蛋白剤として加えたが、その際 AsA は失効することはない、I₂ で当然滴定される。これはブランクとして確かめ

た。それ故試験区および対照区の滴定値より無処理区の滴定値を差引いたものが HCHO によって生じる I_2 の滴定値と考えられる。

この結果から G-CySH を併用した場合、試験区の肝臓に蓄積した HCHO 量は、同時に注射した L-CySH 量が投与 HCHO を中和するよりはるかに不十分な量であったにもかかわらず、G-CySH 無投与の対照区の肝 HCHO 量よりもはるかに少なかった。このことは投与した G-CySH が直接 HCHO と反応したのか、あるいは G-CySH が他の SH-化合物の活性化およびその生成を助長し、それらが HCHO と反応して HCHO 量を減らしたのか、この実験データからは輕輕しく断定を下すことはできないが、とにかく G-CySH の投与は肝 HCHO の量を減少させる効果を示した。

G-CySH の水溶液は 95°C, 30 分の加熱で完全にグルコースと L-CySH に分離する。生体内においてはかかる高温はもちろん得られないが、いわゆる肝における酵素反応により同じような加水分解が起り得るものと想定した。実験の結果は、in vitro において遊離型の L-CySH を使用して得られた基礎実験結果と同様に、G-CySH より生じた L-CySH が投与 HCHO と反応して肝 HCHO の濃度をいちじるしく減少させる結果を示した。

総 括

動物肝へのホルムアルデハイドの蓄積防止を計る目的でマウスを供試し、ホルムアルデヒドの蓄積に対するグルコース・システインの防止効果について検討を行なった。ホルムアルデハイドのみを投与したマウス肝へはその蓄積が高まった。これに反してホルムアルデハイドを投与したものにグルコース・システインをさらに投与した場合にはホルムアルデハイドの蓄積はほとんど起こらなかった。

文 献

1. R.D. STRICKLAND, E.L. MARTIN and J.L. RIEBSOMER: J. B. C., 207, 903 (1954).
2. F.D. TREADWELL: Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, Inc. (1924), pp. 588.